

## 食品中に混入されたパラコートおよびジクワットの迅速分析

青柳 陽子, 天川 映子, 永山 敏廣

### Rapid Determination of Paraquat and Diquat Mixed in Food

Yoko AOYAGI\*, Eiko AMAKAWA\* and Toshihiro NAGAYAMA\*

**Keywords :** パラコート paraquat, ジクワット diquat, 食品 food, 迅速分析 rapid determination, 健康被害 health damage

#### はじめに

突発的に発生する毒物混入事件の被害を鑑み、健康被害発生時の迅速な原因把握に向けて、食品中に混入された有害物質の迅速分析法を確立しておくことが重要である。しかし、食品中に混入された有害物質の中毒量を想定した迅速な分析法に関する報告は少ない。そこで、今回は、農薬のうちでも中毒事例の多いピピリジリウム系除草剤のパラコート (PQ) およびジクワット (DQ) を対象として緊急時対応のための簡易迅速な分析法を検討した。

PQ および DQ は水に溶けやすいため食品への混入が容易である。従来 PQ は単剤として使用されてきたが、毒性が強いこと<sup>1)</sup> から DQ との低濃度混合製剤に切り替えられた。このため食品に混入された場合、PQ および DQ が同時に検出される可能性が高い。また、PQ および DQ はいずれも光分解しやすく、ガラスへの吸着性が高いため、食品を対象とした従来の分析法<sup>2-5)</sup> では煩雑な前処理が必要とされ、測定に時間がかかり、緊急時に用いる分析法としては迅速性に欠けている。

今回は、中毒量を想定して PQ および DQ を迅速に同時分析するための前処理法、比色法を用いた確認法および HPLC 分析条件について検討した。その結果、ハイドロサルファイト反応を利用した比色法により確認試験を行い、フォトダイオードアレイ検出器 (DAD) を装着した HPLC により PQ および DQ を同時に測定する迅速な分析法を確立することができたので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試料

PQ および DQ の混入される可能性がある清涼飲料水 (コーラ飲料)、茶、牛乳、ココア、清酒、オレンジジュース、レトルトカレーを小売店より購入し、添加回収試験用試料として用いた。

##### 2. 試薬等

標準品: PQ は、和光純薬製残留農薬試験用パラコート標準品 (1,1'-ジメチル-4,4'-ジピリジニウムジクロリド)、純度99%、DQ は、Riedel-de Haen 製ジクワット1水和物 (2,2'-ジピリジニウム-1,1'-エチレンジブロミド)、純度99.4%をそれぞれ用いた。

標準溶液: PQ 標準品を13.8 mg、DQ 標準品を19.6 mg 精秤し、それぞれ水に溶解して10 mLとしたものをポリプロピレン (PP) 製容器に冷蔵保存し、適宜、水で希釈して用いた。

検量線用標準液: 標準溶液を水で希釈し1~20 µg/mLの濃度範囲に調製した。なお、これらにはそれぞれ最終的に1.2%になるように過塩素酸を加えた。

トリエチルアミン: 和光純薬製特級品

1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム: 和光純薬製イオンペーアクロマトグラフィー用

0.1%ハイドロサルファイトナトリウム溶液: ハイドロサルファイトナトリウム (和光純薬製化学用) 0.1 gを1 mol/L水酸化ナトリウム溶液に溶解し100 mLとした。用時調製。

トリエチルアミン・リン酸試液: トリエチルアミン4.5 mLを水425 mLに混和後、リン酸でpH 2.5に調整したものに1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム1.4 gを溶解し、水で500 mLにした。

過塩素酸などその他の試薬は市販の特級品、水は精製水を用いた。

マイクロフィルター: 通常のろ過には、ミリポア製 JHPOW13 (径13 mm, 孔径0.45 µm) を、牛乳など抽出液が混濁している場合は、ミリポア製 MILLEXGP (径33 mm, 孔径0.22 µm) を用いた。

##### 3. 装置

冷却遠心機: 佐久間製作所製M-160-IV

HPLC装置: Hewlett Packard社製 SERIES 1100型のポ

\* 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\* Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

ンプ, カラムオープン, オートサンプラー, DAD検出器およびデータ処理機

#### 4. HPLC測定条件

砺波の方法<sup>6, 7)</sup>に準じた。

カラム: L-カラムODS, 4.6 mm i.d. x 250 mm (財団法人化学物質評価研究機構製), 移動相: トリエチルアミン・リン酸試液: アセトニトリル (19:1), 流速: 0.5 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 50  $\mu$ L, 検出波長: PQ (310 nm), DQ (257 nm)

#### 5. 試験溶液の調製

1) 試験溶液の調製 よく混和した試料から1 gを10 mL容量のPP製遠心管に秤取し, これに水5 mLおよび3%過塩素酸4 mLを加えた。30秒間振とう混和後, あらかじめ0°Cに冷却しておいた遠心機で5分間遠心分離 (3,000 rpm) した。上澄を約5 mLとり, ミクロフィルターでろ過し, ろ液を試験溶液とした。

牛乳やレトルトカレーなどたんぱく質や油分を比較的多く含む食品の場合は, 遠心分離後のろ過は, 常用の径13 mm, 孔径0.45  $\mu$ mのミクロフィルターでは目づまりし, また微かな懸濁物が除去できないため, 径30 mm, 孔径0.22  $\mu$ mのものを使用した。

2) 比色法による定性分析 広島大大学院法医学の方法<sup>8)</sup>に従った。

試験溶液1 mLを内径10 mmのガラス製小試験管2本にそれぞれ採った。そのうちの1本に0.1%ヒドロサルファイトナトリウム溶液1 mLを加え, 他の1本には対照として1 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mLを添加し, 混和後, 直ちに色調を比較観察した。なお, 清涼飲料水の場合は, 試験溶液を水で2倍希釈したものを用いた。

3) HPLCによる測定 試験溶液50  $\mu$ LをHPLCに注入した。ピーク面積あるいはピーク高さにより, 絶対検量線法を用いて食品中のPQおよびDQ含有量を算出し, 定量した。また, DADにより吸収スペクトルを測定して標準品と比較し, 同定した。

### 結果および考察

#### 1. 比色法による定性分析

1) 水酸化ナトリウム溶液濃度 ヒドロサルファイト反応はアルカリ性で起きる。砺波は, アルカリ性にするために0.1 mol/Lの水酸化ナトリウム溶液を使用しているが, 酸性物質を多く含む食品では, アルカリの濃度が不足すると述べている<sup>7)</sup>。本法では抽出に際し除たんぱくに用いた過塩素酸を中和し, さらに, アルカリ性にするために1 mol/Lの水酸化ナトリウム溶液を使用した。このことで酸性物質を多く有するものも含めて広範囲の食品に本法が適用できた。また, 1つの試験溶液でHPLCと比色法による定性分析の2法を行うことができ, 分析の迅速化が図れた。

2) 比色法による検出限度 アルカリ性の水溶液中でハ

イドロサルファイトなどの還元剤により, PQは青色, DQは緑色のラジカルに変化する。検出限度を調べるために, それぞれの標準溶液を用いて本法に従って検討した結果, いずれも10  $\mu$ g/mLまで確認できた。次いで, 茶, 牛乳, 日本酒, コーラ飲料, オレンジジュース, ココア, カレーに添加した結果, PQは標準溶液の場合と同様に試料換算で10  $\mu$ g/mL (g) まで確認できたが, DQはこれより10倍高い100  $\mu$ g/mL (g) であった。これは, 食品に由来する試験溶液の色が褐色系統のことが多いため, 発色が緑色のDQは青色のPQに比べ, 判別に際して色の影響を受けやすいためと考えられる。

また, 混合製剤はPQ:DQ (5%:7%) の比が多いことから, 標準溶液を同様の比率で混合してPQ10  $\mu$ g/mL, DQ14  $\mu$ g/mLの添加用混合標準液を調製し, 上記の食品を用いて比色による検出限度を調べた。その結果, コーラ飲料とジュースは, 発色を確認するために試験溶液を水で2倍に希釈する必要があったが, 他の食品では, 希釈することなく試験溶液そのまま明確に判別できた。色調はPQに由来する青色であった。従って, 混合製剤が用いられた場合の検出限度は, コーラ飲料とジュースはPQとして20  $\mu$ g/mL (g), その他の食品はPQとして10  $\mu$ g/mL (g) 程度になると考えられる。

#### 2. HPLCによる分析

PQおよびDQはいずれも高極性であることから, 充填剤などと相互作用を起こしHPLCクロマトグラムにおいてもテーリングしやすい。高感度で測定できるようクリアなピークを得るべくHPLC測定条件について種々検討した結果, 砺波<sup>6, 7)</sup>が報告したODSカラムとイオンペア試薬として移動相にトリエチルアミンと1-ヘキサンスルホン酸ナトリウムを使用した条件下で, 図1に示したようにPQとDQが形状良く明確に分離したクロマトグラムが得られた。

再現性もよく, 標準溶液は1~20  $\mu$ g/mLで直線性が確認された。検出波長はそれぞれの極大吸収波長であるPQは310 nm, DQは257 nmとした。なお, 290 nmで測定すると, ピーク面積あるいはピーク高さが1/2~1/3となるが, 同時に検出することができた (図1)。

また, 図2に示したようにDADを用いて吸収スペクトルを測定し, 標準品のスペクトルと比較することで同定を行った。

HPLCでの検出限界は, PQ, DQいずれも試料1 mL (g) 当たり10  $\mu$ gであった。

#### 3. 添加回収試験

添加量の検討: PQおよびDQが混入される可能性のある茶, カレーなど7種の市販食品を用いて添加回収試験を行った結果を表1に示した。

LD<sub>50</sub>はPQ150 mg/kg, DQ231 mg/kg<sup>9)</sup>で, PQは24%製剤

表1. 市販品を用いた添加回収試験

添加量(μg/g)	PQ				DQ			
	100		10		100		10	
	RC(%)	CV(%)	RC(%)	CV(%)	RC(%)	CV(%)	RC(%)	CV(%)
茶飲料	96.8	3.1	101	1.4	102.2	3.4	101.4	1.5
牛乳	100.7	3.4	102.1	2.9	103.9	3	101.3	2.5
日本酒	98.4	2.2	100.4	1.4	98.5	2.4	100.1	2.3
炭酸飲料(コーラ)	98.1	4.5	99.1	1.3	103.1	4.7	99.6	0.4
オレンジジュース	100.5	1.8	100.8	0.8	100.6	1.5	99.4	0.6
ココア飲料	97.2	4.1	101.4	0.8	100.1	2.9	100.5	0.8
レトルトカレー	102.6	0.9	101.5	1	101.4	2.6	97.9	2

n=3

PQ: パラコート DQ: ジクワット

RC: 回収率(平均値を示した)

10~15 mLで死に至る<sup>1)</sup>。PQは2,000 mg程度の摂取で直ちに健康危害を生じる可能性が高い。今回は目標とする分析値を、摂取した人が高齢者や子供のように普通の成人に比べ体力が劣っている場合も考え、かつ製剤がPQ:DQ 5%:7%混剤であることが多いこと、また、1日の食事量等も考慮し、高濃度添加量をPQ, DQとも100 μg/gとした。また、低濃度添加量として高濃度の1/10量の10 μgとし、添加回収試験を行った。

表に示したようにPQは回収率102.6~96.8%, CV値4.5~0.8%, DQは回収率103.9~97.9%, CV値4.7~0.4%といずれも良好な結果であった。牛乳やカレーなど油脂やたんぱく質の多い食品でも、回収率に問題はなかった。

牛乳の抽出液は、孔径0.22 μmのマイクロフィルターでろ過した後もわずかに白濁していたが、HPLC上は問題なく測定できた。また、カレーの場合は試験溶液を冷却下で遠心分離し、上澄を採取することで特に脱脂操作を必要としなかった。

以上のように本法では、HPLC上妨害する可能性のある抽出液中の食品由来のたんぱく質や油脂分を、冷却遠心分離とマイクロフィルターによるろ過を行うことにより簡便で短時間の操作で除去できた。

### まとめ

ピペリジリウム系除草剤であるPQおよびDQについて、健康被害発生時に速やかにその原因把握に対応するための迅速な同時分析法を検討した結果、

1. 冷却遠心分離とマイクロフィルターによるろ過の簡便な操作により、除たんぱくや脱脂を行うことができ、試験溶液の調製に要する時間が大幅に短縮できた。

2. ハイドロサルファイト反応による比色法で迅速にスクリーニングを行い、検出された際はDAD-HPLC法で定性・定量することにより速やかに対応できることが確認された。
3. PQおよびDQの合剤が使用された時、比色法ではPQとしてコーラ飲料、ジュースでは20 μg/mL(g)、その他の食品では10 μg/mL(g)、HPLCではPQ,DQいずれも1 μg/mL (g)が確認できた。
4. 牛乳やカレーなど7種の市販食品すべてで添加回収率は96.8~103.9%と良好であった。  
以上の結果から、本法は、緊急時対応の迅速分析法として使用できると考える。

### 文 献

- 1) 植村振作, 河村宏, 辻万千子, 他: 農薬毒性の事典, 387-395, 2002, 三省堂, 東京。
- 2) Nagayama, T., Maki, T., Kan, K. and Iida, M.: *J Assoc. off Anal Chem*, **70**, 1008-1011, 1987.
- 3) 環境省農薬登録保留基準の分析法 環境庁告示40 S51.6.11, S61.4.14
- 4) Ritu, K., Manish, R., Vinay, K. and Kumar, G.: *J. AOAC Int*, **80**, 388-391, 1997.
- 5) 岡山明子, 安村浩平, 陰地美樹, 玉置守人: 奈良県衛生研究所年報. **35**, 54-58, 2000.
- 6) 砺波和子: 石川保環研報, **37**, 10-16, 2000.
- 7) 砺波和子: 石川保環研報, **38**, 44-48, 2000.
- 8) 広島大学院法医学 薬毒物迅速検査法: <http://www.nihs.go.jp/yakudoku/paraquathulfite.html>
- 9) 関沢純: 農薬の安全性評価データ集, 121,130, 1991, LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER, 東京。

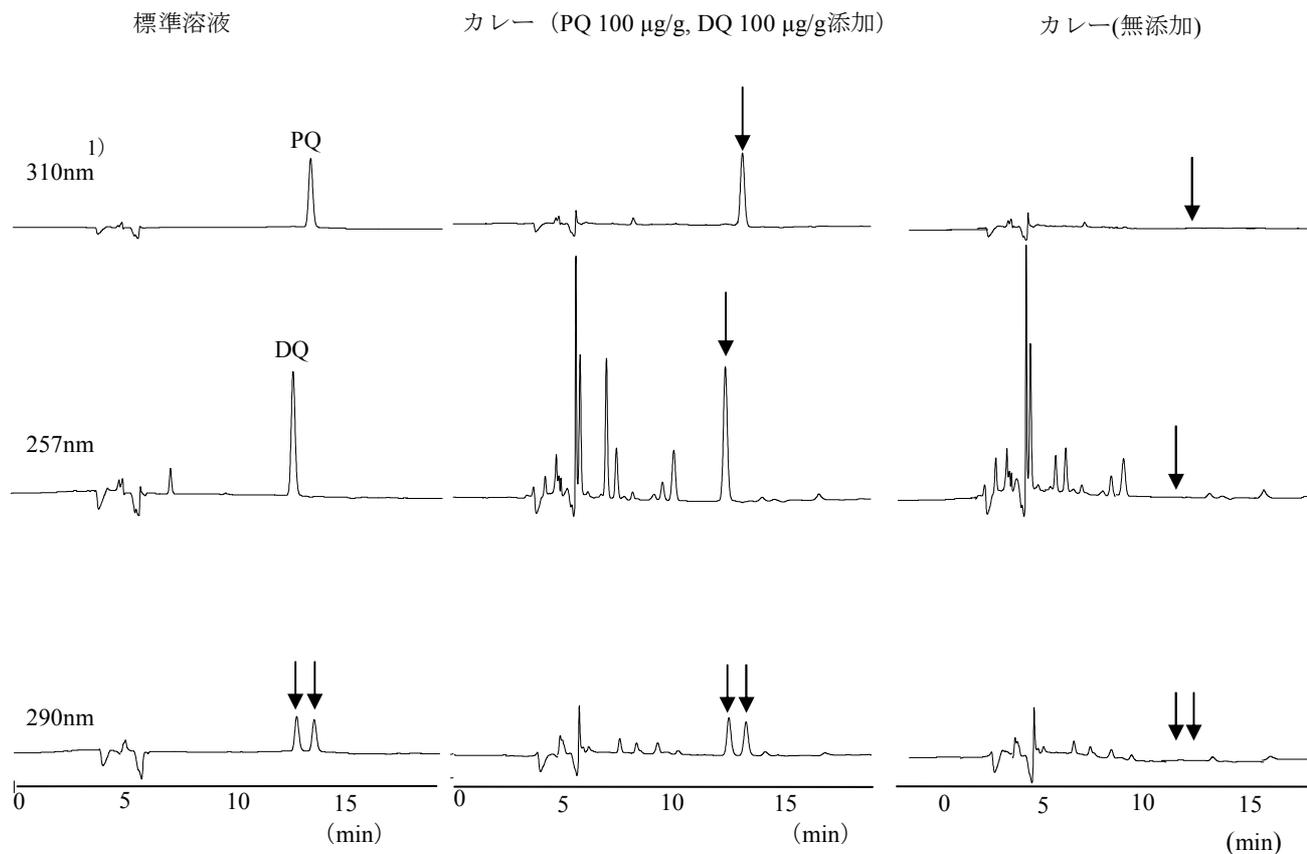


図1. HPLCクロマトグラム

※ 測定条件：実験方法 4. HPLC測定条件に示した。

PQ：パラコート，DQ：ジクワット

1) 検出波長

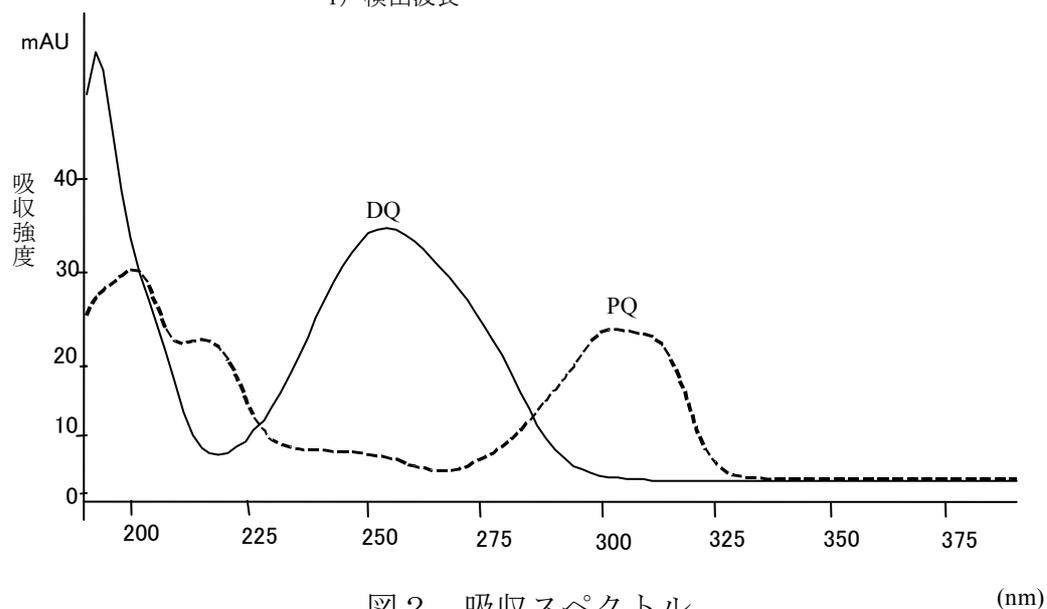


図2. 吸収スペクトル

PQ：パラコート，DQ：ジクワット

※ PQ 10 µg/mL，DQ 10 µg/mL，50 µL注入時におけるDAD測定による。